



شبیم بهرامی - کارشناس ارشد میکروبیولوژی،
دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، گروه میکروبیولوژی، تهران

مقایسه روش Duplex-PCR و رزبنگال در تشخیص بروسلا آبورتوس و بروسلا ملیتنسیس

همکاران؛ گوارا، ۲۰۰۷) و در صورت عدم تشخیص سریع و مناسب عوارض شدیدی در بیمار ایجاد می‌کند (اکبرزاده و همکاران، ۲۰۱۵). برخی از گونه های آن به عنوان عوامل بیوتروریسم مطرح می شوند (دیوید فرانس، ۱۹۹۷). بروسلا از راه بریدگی و خراش های ایجاد شده در سطح پوست و مصرف مواد غذایی آلوده، تماس مستقیم با حیوان آلوده و استنشاق ذرات آلوده وارد بدن میزبان پستاندار خود می شود (ممیش و همکاران، ۲۰۰۰؛ یانگ، ۱۹۹۵). بروسلوزیس یکی از مهمترین بیماری های انسان و حیوان در کشورهای در روند پیشرفت است. بروسلوزیس یکی از بیماری های بومی کشورما است (شفیعی و همکاران، ۱۳۹۱). بروسلوزیس تظاهرات بالینی متنوعی دارد (شن، ۲۰۰۸؛ منچور، ۲۰۰۷) ویژگی های خاص بالینی، تشخیصی و درمانی آن می تواند مشکلاتی در اداره بیماران، برای پزشکان ایجاد نماید. این بیماری بیشتر در مناطق مدیترانه (پاپاس و ممیش، ۲۰۱۳) از جمله هند (اسمیت و کادریس، ۲۰۰۵)، قسمت هایی از آمریکای لاتین و مکزیک، جنوب امریکا شایع است (پاپاس و همکاران، ۲۰۰۶). از طرفی شرایط جغرافیایی کشور ما و مساله نیاز به دامپروری و کشاورزی، کنترل این بیماری در دام را با مشکل مواجه می نماید (دوگاه و پور فرضی، ۱۳۸۹). تشخیص کلاسیک این باکتری معمولاً بر مبنای روش های سرولوژی و کشت انجام می شود. این تکنیک ها وقتگیر، با حساسیت نسبتاً پایین، نیازمند امکانات و همینطور تجربه کافی جهت تفسیر نتایج است. در چند دهه گذشته، روش های مولکولی متعددی به

باکتری بروسلا عامل بیماری زایی تب مالت است. تب مالت یکی از مهمترین بیماری های مشترک میان انسان و دام است. راه مهم انتقال این میکروارگانیسم مصرف مواد غذایی آلوده است. نشانگان بالینی آن متنوع و غیراختصاصی است. لذا تشخیص این بیماری نیازمند روش های سریع و دقیقی مانند PCR است. هدف از این بررسی، تشخیص همزمان بروسلا آبورتوس و بروسلا ملیتنسیس در نمونه های سرم به روش Duplex PCR و سنجش آن با روش معمولی رزبنگال است.

روش کار: شمار ۱۰۰ نمونه سرم از آزمایشگاه دامپزشکی جمع آوری و DNA آنها به روش DNG-plus استخراج شد. تست های Mono-plex PCR بروسلا آبورتوس و ملیتنسیس و سپس Duplex PCR هر دو عامل بهینه شد. حد تشخیص و ویژگی بررسی و بر روی نمونه ها تست Duplex PCR انجام و محصول PCR به روش T/A cloning در پلاسمید PTZ5YR کلون گردید. محصول ۷۳۳ و ۴۹۴ جفت بازی از بروسلا آبورتوس و بروسلا ملیتنسیس در ژل آگارز مشاهده شد. حد تشخیص تست های مونوپلکس برای هر دو عامل ۱۰۰ DNA/Reaction محاسبه شد. از ۱۰۰ نمونه مورد بررسی، ۴۰ نمونه رزبنگال مثبت بود که ۳۵ نمونه توسط Duplex PCR مثبت شد، ۳۱ نمونه بروسلا آبورتوس و ۴ نمونه بروسلا ملیتنسیس تعیین شد و از ۶۰ نمونه رزبنگال منفی، ۲۰ نمونه توسط Duplex PCR مثبت و از این تعداد، ۱۷ نمونه بروسلا آبورتوس و ۳ نمونه بروسلا ملیتنسیس شد. نتیجه گیری: تعداد نمونه های مثبت به روش Duplex PCR بیشتر از تست رزبنگال مشاهده شد و می توان گفت Duplex PCR روش مطمئن و دقیق تری جهت بررسی نمونه ها است.

بروسلوزیس یک بیماری باکتریایی مشترک بین انسان و حیوانات مختلف است، که با گونه های بروسلا ایجاد می شود. اگرچه این بیماری به ندرت کشنده است (فرانکو و

جدول ۱: مشخصات آغازگر های مورد استفاده		
ژن	محصول توالی پرایمر	طول قطعه تکثیری
(بروسلا ملی تنسیس) <i>B1-F</i> <i>IS711</i>	5'-AAATCGCGTCCTTGCTGGTCTGA-3' 5'-TGCCGATCACTTAAGGGCCTTCAT-3'	733bp
(بروسلا آبورتوس) <i>B2-F</i> <i>IS711</i>	5'-GACGAACGGAATTTTCCAATCCC-3' 5'-TGCCGATCACTTAAGGGCCTTCAT-3'	494 bp

(جدول ۱) ذکر شده است (میرنژاد، ۲۰۱۲). بررسی نرم افزار مولکولی این پرایمر ها نشان داد که سکانس های انتخاب شده از هر ژن، توالی مناسبی برای شناسایی بروسلا آبورتوس و بروسلا ملی تنسیس است. در این روش جهت بهینه کردن تکنیک PCR، غلظت و حجم مناسب اجزای مورد نیاز این متد بررسی و ارزیابی شد که در نهایت مقادیر مورد نیاز در یک تست PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر به دست آمد. همچنین پروفایل دمایی از طریق روش گرادیانت مخصوصا از جهت دمایی انلینگ، در یک بازه دمایی با محدوده ۱۰ درجه ای جهت هر دو تست مونوپلکس بروسلا بررسی شد.

کلونینگ محصول PCR

بعد از خالص سازی، محصول PCR با استفاده از کیت T/A cloning (Thermo Scientific K1213) و وکتور pTZ57R کلون شد. پلاسمیدهای حاصل به روش لیز قلیایی استخراج شد.

تعیین حساسیت تست PCR

بدین منظور، با استفاده از DNA استخراجی بروسلا آبورتوس و بروسلا ملی تنسیس، که میزان غلظت آن با دستگاه نانودراپ اندازه گرفته شده بود، استفاده شد. تعداد ژنوم در هر میکرولیتر نمونه از طریق فرمول Genome Copy Number (GCN) محاسبه شد. از DNA مورد نظر با غلظت مشخص سریال های رقتی تهیه شد. به این ترتیب که در ۷ میکروتیوب میزان ۹۰ میکرولیتر آب دوبار تقطیر وارد کردیم. سپس به لوله اول ۱۰ میکرولیتر از DNA استخراج شده اضافه کردیم. در مرحله بعد ۱۰ میکرولیتر از لوله اول برداشت نموده و به لوله دوم منتقل نمودیم. به همین ترتیب ادامه دادیم و رقت های سریالی از نمونه را بدست آوردیم.

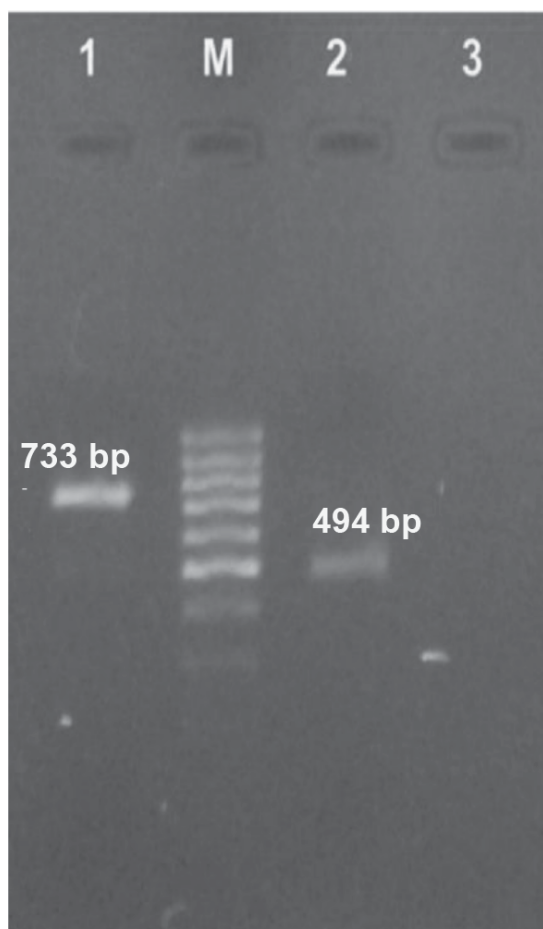
ویژه روش های بر مبنای تکثیر توالی اسیدهای نوکلئیک اختصاصی پاتوژن ها توسعه یافته اند که امکان شناسایی سریع میکروارگانیسم ها با حساسیت و اختصاصیت بسیار بالا نسبت به روش های سنتی را مهیا ساخته اند. یکی از مهمترین این روش ها تکنیک PCR است (ورنت، ۲۰۰۴). با توجه به اهمیت تشخیص سریع و دقیق بروسلا آبورتوس و بروسلا ملی تنسیس در بیماران مبتلا به بروسلوزیس به منظور درمان به موقع و جلوگیری از بروز عوارض ثانویه و همچنین با توجه به وقت گیر بودن روش کشت، لزوم متدی سریع، حساس، آسان در عین حال کم هزینه، اختصاصی و در دسترس ضروری است. دراین پژوهش از روش Duplex-PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی به منظور شناسایی بروسلا آبورتوس و بروسلا ملی تنسیس استفاده شده است. هدف از این مطالعه ایتیمایز نمودن تست Duplex-PCR جهت تشخیص هم زمان بروسلا آبورتوس و بروسلا ملی تنسیس و مقایسه نتایج آن با تست رزبنگال است.

مواد و روش ها

استخراج DNA از سویه استاندارد بروسلا آبورتوس و بروسلا ملی تنسیس:

به منظور بهینه نمودن تست PCR جهت تشخیص دوگونه مذکور، سویه های استاندارد بروسلا آبورتوس به شماره (ATCC23448) و بروسلا ملی تنسیس به شماره (ATCC23457) تهیه و DNA با استفاده از کیت DNG-Plus شرکت سیناکلون (DN8117C) استخراج شد.

بهینه نمودن تست PCR: پرایمرهای مورد استفاده جهت آزمون PCR در این مطالعه از مقاله میرنژاد و همکاران در سال ۲۰۱۲ استفاده شد که مشخصات آنها در



شکل ۱: آزمون PCR بهینه شده جهت تشخیص بروسلا آبورتوس و بروسلا ملی تنسیس

M: مارکر 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific)

۱: بروسلا ملی تنسیس، ۲: بروسلا آبورتوس، ۳: کنترل منفی

تعیین حساسیت تست PCR:

تست حساسیت PCR با تهیه رقت های متوالی از DNA بروسلا آبورتوس و بروسلا ملی تنسیس انجام گرفت که نتایج حساسیت تست PCR نشان داد که با وجود فقط ۱۰۰ کپی از DNA، تکثیر انجام میگیرد و در تیتراهای کمتر از ۱۰۰ کپی از DNA بانندی مشاهده نشد که نشان از حساسیت بالای تست است.

تعیین ویژگی تست PCR:

نتایج بررسی ها نشان دادند که آزمون PCR بهینه شده از اختصاصیت بسیار بالایی برخوردار است، بطوری که فقط با DNA باکتری بروسلا آبورتوس و بروسلا ملی تنسیس واکنش نشان می داد و با DNA سایر میکروارگانیسم های مورد مطالعه هیچ واکنشی دیده نشد. **انجام تست رزبنگال:** از تعداد ۱۰۰ نمونه سرم مورد

سپس بر روی همه رقت ها به همراه کنترل مثبت و منفی تست PCR گذاشته شد.

تعیین ویژگی تست PCR

برای تعیین اختصاصیت آزمون PCR بهینه شده در بروسلا ملی تنسیس و آبورتوس، DNA باکتری های اشیریشیاکلی، لیستریا مونوسایتوزنز، سودوموناس آئروژنوزا، استافیلوکوکوس اورئوس، لژیونلا پنوموفیلا، سالمونلا تیفی موریوم و استرپتوکوکوس پیوژنز را با استفاده از کیت DNG-plus شرکت سیناکلون (DN8117C) استخراج کرده و آزمون PCR بهینه شده را به همراه نمونه کنترل مثبت و منفی مورد ارزیابی قرار دیم.

جمع آوری نمونه

تعداد ۱۰۰ نمونه سرم گاو و گوسفند میکروتیوب های استریل از آزمایشگاه دامپزشکی واقع در شهریار، جمع آوری و در شرایط سرد به آزمایشگاه منتقل شد. استخراج DNA از نمونه های سرم با کمک کیت تجاری DNG-Plus شرکت سیناکلون صورت گرفت.

تست رزبنگال

جهت انجام تست رزبنگال ۱ قطره سرم به همراه ۱ قطره آنتی ژن رزبنگال را بر روی اسلاید شیشه ای قرار داده و به کمک سر سمپلر آنها را یکنواخت و به مدت ۴ دقیقه بر روی روتاتور قرار می دهیم سپس نتایج آگلوتیناسیون را گزارش می کنیم.

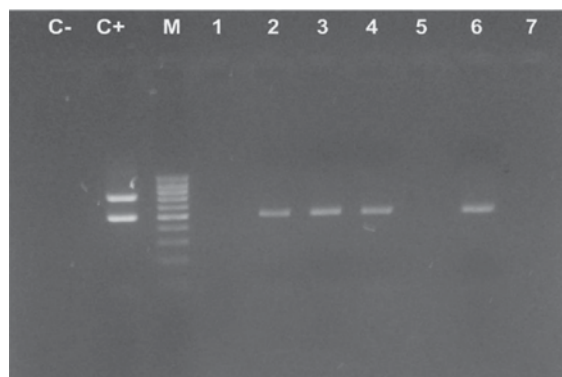
یافته ها

بهینه نمودن تست PCR:

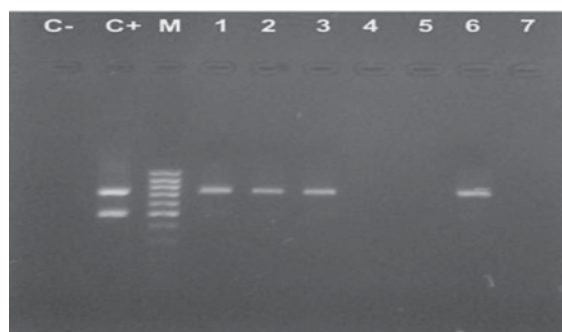
دمای مرحله annealing برای بروسلا آبورتوس و بروسلا ملی تنسیس، ۶۶ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه بدست آمد. پس از بهینه کردن تست PCR از جهت اجزای و پروفایل حرارتی با استفاده از پرایمر های اختصاصی بروسلا آبورتوس و بروسلا ملی تنسیس، طبق برنامه حرارتی مناسب، یک دور PCR در مورد آنها اجرا شد و DNA سویه استاندارد در کنار نمونه کنترل منفی و در کنار سایز مارکر بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ مورد ارزیابی قرار گرفت. در الکتروفورز محصول PCR، باند اختصاصی حاصل از آمپلیکون های مورد نظر که ۷۳۳ (بروسلا ملی تنسیس) و ۴۹۴ (بروسلا آبورتوس) جفت باز طول داشتند، قابل رویت بود (شکل ۱).

بررسی، ۴۰٪ از کل سرم‌ها به جهت وجود بروسلا توسط تست رزینگال مثبت و ۶۰٪ منفی شدند.

انجام تست Duplex-PCR بر روی نمونه‌های سرمی: DNA ی ۱۰۰ نمونه مورد مطالعه به روش DNG-Plus استخراج شد و تست Duplex-PCR بر روی آنها انجام گرفت. تعداد ۵۵ نمونه (۵۵٪) نتیجه مثبت قطعی نشان دادند که از این تعداد ۴۸ مورد بروسلا آبورتوس و ۷ مورد بروسلا ملی تنسیس اعلام شد (شکل ۳ و ۲).



شکل ۲: تشخیص Duplex PCR بروسلا آبورتوس و بروسلا ملی تنسیس بر روی تعدادی از نمونه‌ها
C-: کنترل منفی، C+: کنترل مثبت، M: مارکر DNA Ladder (Thermo Scientific) ۱۰۰ bp
۲-۶: نمونه‌های مثبت بروسلا آبورتوس ۱، ۵، ۷ نمونه‌های منفی بروسلا آبورتوس



شکل ۳: تشخیص Duplex PCR بروسلا آبورتوس و بروسلا ملی تنسیس بر روی تعدادی از نمونه‌ها
C-: کنترل منفی، C+: کنترل مثبت، M: مارکر DNA Ladder (Thermo Scientific) ۱۰۰ bp
۱-۶: نمونه‌های مثبت بروسلا ملی تنسیس
۴، ۵، ۷ نمونه‌های منفی بروسلا ملی تنسیس

بحث و نتیجه گیری

بروسلوز یک بیماری عفونی باکتریایی است که توسط میکروارگانیسمی از جنس بروسلا ایجاد می‌شود. این باکتری

گونه‌های مختلفی از حیوانات را مبتلا ساخته و یکی از عوامل مهم سقط جنین در گوسفند و بز است. بروسلوز یکی از مهمترین بیماری‌های ژئونوز به شمار آمده و در اغلب کشورها از جمله کشورهای منطقه مدیترانه و خاورمیانه مانند ایران شایع است (کاستروسی و سیلی، ۱۹۹۱).

بیشتر نمونه‌های سقط جنین گوسفند و بز در ماه آخر آبستنی روی می‌دهد، که علت آن معمولاً بیماری‌های عفونی نظیر بروسلوز، کمپیلوباکتریوز، توکسوپلاسموز، کلامید یوز و تب کیو است (الدومی و همکاران، ۲۰۰۹). خسارات اقتصادی بروسلوز عموماً به علت سقط جنین، جفت ماندگی و به میزان کمتری تورم بیضه و اپیدیدیم و غدد ضمیمه جنسی و تورم مفاصل است. همچنین ممکن است گاهی به دنبال متريت حاد و در اثر جفت ماندگی حیوان تلف شود (رادوستیتس و گای، ۲۰۰۷). بیماری در انسان به تب مالت معروف بوده و از راه مصرف شیر خام و فرآورده‌های غیر پاستوریزه آنها و یا تماس با ترشحات دام آلوده بعد از سقط جنین به انسان منتقل می‌شود. (خوراسگانی و همکاران، ۲۰۰۸).

اولری و همکاران در سال ۲۰۰۶، جهت تشخیص بروسلا آبورتوس در خون، شیر و بافت لنفاوی گاوهای با نتایج سرولوژی مثبت از روش PCR استفاده کردند. بروسلوزیس را می‌توان به روش‌های سرولوژیک و باکتریولوژیک تشخیص داد. به روش PCR می‌توان نواحی مختلف ژنوم بروسلا از جمله عناصر ژنتیکی 16S rRNA، پروتئین غشای خارجی 31 KD و IS711 را تکثیر و بهینه کرد. در این تحقیق بروسلا آبورتوس از نمونه‌های خون جمع‌آوری شده از گاوهای آلوده به روش PCR معمولی و Real-Time PCR جداسازی نشد. اما بروسلا در نمونه‌های شیر آلوده (کشت مثبت) ۴۴٪ و در نمونه‌های لنفاوی (پشت حلقی ۷۵٪ و پستانی ۶۶٪) شناسایی شد. در این صورت تفاوتی میان روش‌های باکتریولوژیک و PCR مشاهده نشد (اولری و همکاران، ۲۰۰۶).

میشایرو و همکاران به وسیله تکنیک PCR اقدام به شناسایی بروسلا آبورتوس در نمونه‌های پنیر نمودند. آنها از پرایمرهای B5 و B4 استفاده نمودند و محصول PCR تکثیر یافته به وسیله این پرایمرها ۲۲۳ جفت باز اندازه داشت. از ۱۹۲ نمونه مورد بررسی در این مطالعه

کلیه نمونه های کشت منفی بودند در حالی که ۱۹/۲۷٪ نمونه های PCR مثبت بودند (میاشیرو و همکاران، ۲۰۰۷). آقای کومار سانجای و همکارانش، از روش Multiplex PCR جهت تشخیص و جداسازی همزمان بروسلا سوئیس، بروسلا آبورتوس و بروسلا ملی تنسیس در نمونه های استاندارد کشت داده شده استفاده کردند. آنها از پرایمر هایی استفاده کردند که بریکر و همکارانش در سال ۱۹۹۴ برای جداسازی گونه های بروسلا طراحی کرده بودند (بریکر و هالینگ، ۱۹۹۴). با استفاده از این روش و تنها در یک واکنش، موفق به شناسایی ۳ گونه بروسلا در مدت زمان کمتر از ۲ ساعت شدند. آنها در ارزیابی کارایی روش فوق در نمونه های بالینی، از ۸ نمونه خون کشت مثبت از نظر بروسلا ملی تنسیس استفاده کردند و اعلام کردند که روش Multiplex PCR نیز جهت شناسایی گونه های بیماری زای بروسلا در نمونه های بالینی نظیر خون نیز کاربرد داشته باشد (سانجای و همکاران، ۲۰۱۱). کچاگیا و همکاران، دو جفت پرایمر اختصاصی جنس بروسلا را در روش PCR برای تشخیص بروسلوزیس در ۷۸ نمونه خون کامل به کار گرفتند. پرایمر های مورد مطالعه توسط آنها را B4-B5 (که ژن کد کننده پروتئین ایمونوژنی غشایی ویژه جنس بروسلا به نام پروتئین BCSP31 را تکثیر می کرد) و JPF/JPR (که ژن کد کننده پروتئین غشا خارجی به نام پروتئین OMP-2 را تکثیر می کرد) تشکیل میداد محققان موفق شدند که DNA مربوط به جنس بروسلا را در ۴٪ کل افراد (۳ مورد از ۷۸ مورد) شناسایی کنند که البته همه آنها دارای اختلالات روانی بودند. در نهایت برای تایید نهایی محصولات مثبت PCR، توالی یابی شدند که نشان می داد ۹۹/۹٪ شباهت با DNA بروسلا ملی تنسیس بود. بنابراین آنها ظهور علائم روانی مخصوصا افسردگی را در ساکنین مناطق اند می بروسلوزیس زنگ خطری دانستند که می تواند شک به بروسلوزیس مزمن را در این نواحی افزایش دهد (کچاگیا و همکاران، ۲۰۱۱).

آنا دین و همکاران، در منطقه توگو نمونه ها را به صورت کاملاً تصادفی از میان ۲۵ روستا که شامل ۶۸۳ نفر، ۵۹۶ راس گاو، ۴۶۵ گوسفند و ۲۲۱ بز بود، انتخاب کردند. علاوه بر این تعداد ۴۶۴ گاو صحراگرد از بورکینافاسو نیز مورد بررسی قرار گرفتند. آنالیز های سرولوژی به روش رز بنگال و الایزا برای بروسلوزیس و الایزا و روش ایمونوفلوئورسنس

برای تشخیص تب Q بروسلوزیس استفاده شد نتایج حاکی از آن است که با تنها ۷ مورد که توسط روش های سرولوژی مثبت شد این بیماری مشکل عمده برای انسان در این منطقه محسوب نمی شود. از طرفی بروسلا آبورتوس از ۳ نمونه گاو جدا شد (آنادین و همکاران، ۲۰۱۳).

جمال وارث و همکاران، در مصر بر روی تشخیص DNA بروسلا آبورتوس در نمونه سرم بز و گوسفندان سقط شده با روش Real Time PCR کار کردند. در این مطالعه بر روی ۲۵ حیوان (۱۰ گاو، ۵ بوفالو، ۹ بز، ۱ میش) که به صورت خود به خودی سقط شده اند کار شد. جهت استخراج DNA از کیت آلمانی DNA HP استفاده شد. DNA بروسلا آبورتوس در سرم بز و گوسفند که اخیراً سقط شده اند به روش RT-PCR تشخیص داده شد. در تحقیق حاضر بروسلا آبورتوس و بروسلا ملی تنسیس از ۱۰۰ نمونه سرم های گاو و گوسفند جداسازی شد و به منظور جداسازی DNA از کیت ایرانی DNG-Plus استفاده شد که از نظر هزینه به صرفه تر بوده و دسترسی به آن آسان تر است، از طرفی در RT-PCR مدت زمان انجام تست طولانی تر شده و دستگاه های مورد استفاده در این تکنیک بسیار پر هزینه است و ازین رو روش مولکولی PCR بیشتر مورد استقبال قرار گرفته است. لازم به ذکر است تعداد ۱۰۰ نمونه انتخابی در مطالعه فعلی، در آزمون های آماری جز سختگیرانه ترین تعداد نمونه است (جمال وارث و همکاران ۲۰۱۵).

با استناد به محاسبات انجام شده و نمودارهای رسم شده می توان عنوان کرد که نتایج تست Duplex PCR به مراتب نسبت به تست رز بنگال دقیق تر بوده و در نتایج حاصل تست رز بنگال شاهد نتایج مثبت و منفی کاذب بودیم به طوری که از میان ۴۰ نمونه رز بنگال مثبت، ۵ نمونه توسط تست Duplex PCR رد شد که نشان دهنده خطای ۱۲/۵٪ تست رز بنگال است و از میان ۶۰ نمونه رز بنگال منفی، ۲۰ نمونه توسط تست Du-plex PCR تایید شدند که نشان دهنده خطای ۳۳٪ تست رز بنگال است.

نتایج این تحقیق حاکی از آن است که تست رز بنگال یکی از آزمایشات مقدماتی بسیار با ارزش بوده و بیشتر، این روش جهت تشخیص اولیه در برنامه های کنترل

results by PCR-RFLP" Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences 20(1): Pe10-Pe17, En12.

4. Aldomy, F., N. Hussein, L. Sawalha, K. Khatatbeh and A. Aldomy (2009). "A national survey of perinatal mortality in sheep and goats in Jordan." Pakistan Veterinary Journal 29(3): 102-106.

5. Bricker, B. J. and S. M. Halling (1994). "Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR." Journal of Clinical Microbiology 32(11): 2660-2666.

6. Castrucci, G. a. V. C. (1991). "Brucellosis. In: Diseases of Sheep." Blackwell Scientific Publications: 34.

7. Dean, A. S., B. Bonfoh, A. E. Kulo, G. A. Boukaya, M. Amidou, J. Hattendorf, P. Pilo and E. Schelling (2013). "Epidemiology of brucellosis and Q fever in linked human and animal populations in northern togo." PLoS One 8(8): e71501. Franco, M. P., M. Mulder, R. H. Gilman and H. L. Smits (2007). "Human brucellosis." The Lancet infectious diseases 7(12): 775-786.

8. Franz, D. R., P. B. Jahrling, A. M. Friedlander, D. J. McClain, D. L. Hoover, W. R. Bryne, J. A. Pavlin, G. W. Christopher and E. M. Eitzen (1997). "Clinical recognition and management of patients exposed to biological warfare agents." Jama 278(5): 399-411

9. Guerra, H. (2007). "The brucellae and their success as pathogens." Critical reviews in microbiology 33(4): 325-331.

10. Kechagia, M., S. Mitka, E. Papadogiannakis, V. Kontos and C. Koutis (2011). "Molecular Detection of *Brucella* spp. DNA in Patients with Manifestations Compatible with Emotional Disorders." Open Infectious Diseases Journal 5: 8-12.

11. Khorasgani, M. R., H. Esmaeili, M. Pourkarim, A. Mankhian and T. Z. Salehi (2008). "Anti-brucella antibodies in blood donors in Boushehr, Iran." Comparative Clinical Pathology 17(4): 267-269.

12. Mantur, B., S. Amarnath and R. Shinde (2007). "Review of clinical and laboratory features of human brucellosis." Indian journal of medical microbiology 25(3): 188.

13. Memish, Z., M. W. Mah, S. Al Mahmoud, M. Al Shaalan and M. Y. Khan (2000). "Brucella bacteraemia: clinical and laboratory observations in 160 patients." Journal of Infection 40(1): 59-63.

14. Mirnejad, R., R. H. Doust, R. Kachuei, S. M. Mortazavi, M. Khoobdel and A. Ahamadi (2012). "Simultaneous detection and differentiates of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* by combinatorial PCR." Asian Pacific journal of tropical medicine 5(1): 24-28.

15. Miyashiro, S., E. Scarcelli, R. M. Piatti, F. R. Campos, A. Vialta, L. B. Keid, R. A. Dias and M. E. Genovez (2007). "Detection of *Brucella abortus* DNA in illegal cheese from São Paulo and Minas Gerais and differentiation of B19 vaccinal strain by means of the polymerase chain reaction (PCR)." Brazilian Journal of Microbiology 38(1): 17-22.

16. O'Leary, S., M. Sheahan and T. Sweeney (2006). "Brucella abortus detection by PCR assay in blood, milk and lymph tissue of serologically positive cows." Research in veterinary science 81(2): 170-176.

17. Pappas, G. and Z. Memish (2013). "Brucellosis in the Middle East: a persistent medical, socioeconomic and political issue." Journal of Chemotherapy.

18. Pappas, G., P. Papadimitriou, N. Akritidis, L. Christou and E. V. Tsianos (2006). "The new global map of human brucellosis." The Lancet infectious diseases 6(2): 91-99.

19. Vernet, G. (2004). "Molecular diagnostics in virology." Journal of clinical virology 31(4): 239-247.

20. Sanjay, K., K. Sarika and A. Kumar (2011). "Rapid multiplex PCR assay for the simultaneous detection of the *Brucella* Genus, *B. abortus*, *B. melitensis*, and *B. suis*." Journal of microbiology and biotechnology 21(1): 89-92.

و ریشه کنی بروسلوز به عنوان تست غربالی به کار برده می شود که قبل از انجام سایر آزمایشات سرولوژیک قابل اجرا است. توصیه می شود به علت احتمال بروز پدیده پروزون و مشاهده پاسخ منفی کاذب، آزمایش تمامی نمونه های سرم با روش لوله ای انجام شود. هم چنین فاز رشد باکتری می تواند واکنش های منفی کاذب ایجاد کند. از آنجا که ممکن است آنتی بادی های (آگلوتینین) موجود در سرم فرد تست شونده در اثر عفونت های باکتریایی دیگری غیر از باکتری بروسلا تولید شده باشند، باید دقت کرد که این بروز آگلوتیناسیون و مثبت شدن تست ممکن است ناشی از باکتری بروسلا نباشد از این جهت حتما تست مثبت رزبنگال نیاز دارد که با تست های اختصاصی تر مورد تایید قرار گیرد. روش های مولکولی چندین سال است که بطور جدی در تشخیص عوامل مولد بیماری های عفونی مورد استفاده قرار گرفته است و جوامع متعدد علمی در خارج و داخل کشور با توجه به مزایای این روش ها از جمله سرعت، هزینه، دقت و صرفه جویی در زمان از آن استفاده می کنند و بیشتر مطالعات دقیق خود را بر پایه این روش ها متمرکز ساخته اند. روش های مولکولی در حال حاضر، روشی معتبر و پذیرفته شده به عنوان روش استاندارد شده هستند. در نهایت می توان گفت که روش Duplex PCR که در این مطالعه جهت تشخیص بروسلا آبورتوس و بروسلا ملی تنسیس استفاده شد، روش مطمئن تر و ایمن تری به دلیل داشتن نتایج مثبت بیشتر نسبت به تست رزبنگال بوده و می توان از این تکنیک در تشخیص سریع و دقیق بروسلوزیس استفاده کرد.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله کمال تشکر و قدردانی خود را از کمک های بی شائبه موسسه دانش بنیان ایرانیان ژن فناوری و پرسنل محترم این موسسه ابراز می نمایم.

منابع

- ۱- پیری دوگاه، ه. پورفرضی ف. ۱۳۸۹. مقایسه روش الیزا و آزمون استاندارد لوله ای (رایت) جهت تشخیص بروسلوز انسانی. کنگره میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، ۴.
- ۲- شفیعی ب.، احمدی م.، دستمالچی س.، کاظمی ح. ۱۳۹۱. مقایسه آزمون PCR و آزمون حلقه ای شیر در تشخیص بروسلا در شیر گاو. کنگره میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، ۲.
3. Akbarzadeh, E., J. Noroosi, V. Piranfar, D. Ghasemi, S. Mirka-lantari and R. Mirnejad (2015). "Simultaneous identification and comparison of pathogenic *Brucella* species in human serum and blood samples by means of multiplex PCR and confirmation of the